

ポンプの稼動 Figure 17はそれを組み上げたNafionポンプの写真である。なお組み上げる際にはFigure 16に示したスペーサーは水平に(Nafionと平行になるように配置する)する。更に、袋に入れた水は紫色に着色してある。

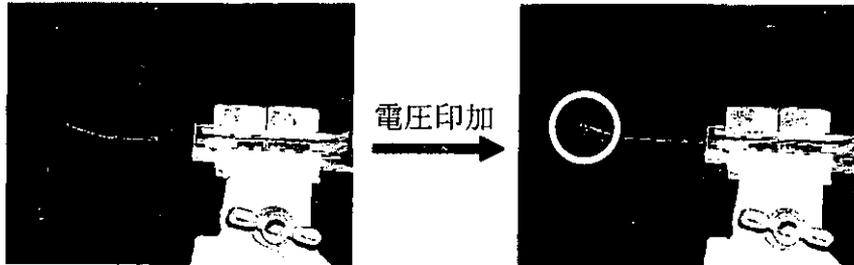


Figure 17 電圧印加による水(紫色に着色)の排出

このNafionポンプの駆動部は前記の通り、脱水したNafionではなく硫酸銅と硫酸の混合水溶液を含んでいるため制御性、駆動時間に劣るが、流量=数 $\mu\text{l/s}$ を実現した。

4. 結論

脱水により印加電圧下における電解質性高分子膜の(i) 低耐久性、(ii) 低発生力、(iii) 屈曲緩和発生、(iv) 発生力緩和発生、の問題が解決できる可能性を見出すことが出来た。

Nafionポンプを試作し、流量=数 $\mu\text{l/s}$ の性能を実現した。

カーボンナノファイバーのサイズ制御

東北大学大学院工学研究科

佐藤義倫

東北大学大学院環境科学研究科

田路和幸

1. はじめに

近年、フラーレン (fullerenes) ¹⁾、カーボンナノチューブ (carbon nanotubes; CNTs) ²⁾、カーボンナノファイバー (carbon nanofibers; CNFs) ³⁾などの sp^2 混成軌道で結合された籠状構造を持つ炭素物質が電界電子放出源、複合材料、電池電極などの機能性炭素材料として期待されている ⁴⁾。とりわけ、炭素 2 重結合からなる円筒構造に由来する高強度、高弾性率を持つ CNTs の機械特性は、歯根や骨などに代替材料として生体材料分野で興味を持たれており、また、CNTs や CNFs が持つナノサイズの空間と大きな比表面は、「遺伝子導入のためのベクター」、「インターカレーションによる生体過剰イオンの除去」、「機能性糖鎖の吸着」などのナノサイズのキャリアを用いたドラッグターゲティングに使われる機能としても注目されている ⁵⁾。

炭素材料を生体材料に応用する試みは、グラファイトが高血栓性に優れていることから始まり ⁶⁾、その後、主に炭素繊維強化炭素複合材料 (carbon fiber-reinforced carbon composite; C/C composite) を使った人工心臓弁、人工関節、骨固定具、人工歯根材 ⁷⁾などを中心に研究されてきた。歯根などのバルクサイズで応用する炭素材料の場合は生体親和性があると報告されているが、ナノサイズの炭素材料を生体に応用する場合には、形状やサイズによる生体適合性を調べなければならない。よって、CNTs、CNFs の生体適合性を調べるためには、それらが水に分散・可溶化することが必須であり、また細胞に取り込まれる大きさにしなければならない。CNTs の水溶化では、グラファイトシートが円筒状に繋ぎ目のない構造を持つことによりグラファイトエッジが露出されず、親水基を付加させるサイトがないために水溶化が困難であること、また水溶化させる界面活性剤は生体内の反応に影響を与え、起こっている反応事象を複雑化するために使用することができないことなどが問題となっている。一方、コーン状グラフィンを重ねた構造を持つ繊維状の CNFs はコーンの端にグラフィンのエッジが存在するため、多くの親水基や特異的な官能基を付加することができる。また、それぞれのコーンは結合力の弱いファンデルワールス結合であり、コーンを切り離すことによって CNFs を切断し、CNFs のサイズを制御することも可能である。

本研究では、CNFs の親水化向上のため、酸化力の強い硫酸と硝酸の混液で CNFs のエッジを酸化し、親水基を付加させた。また、同時に超音波照射を行うことで CNFs の切断

を行った。CNFs の形態は走査形電子顕微鏡 (scanning electron microscope; SEM) 、透過形電子顕微鏡 (transmission electron microscope; TEM) 、X 線回折測定 (X-ray diffraction; XRD) を用いて調べた。CNFs に付加された置換基はフーリエ変換赤外分光測定 (fourier transform infrared spectroscopy; FT-IR) で調べ、CNFs サンプル中に含まれる元素は TEM に装備しているエネルギー分散型 X 線分析 (energy disperse X-ray analysis; EDX) によって調べた。

2. 実験

2-1. CNFs の合成・精製

コーン状グラフィンを重ねた構造を持つ CNFs は、化学気相蒸着法 (chemical vapor deposition; CVD) により Ni 触媒を用いて合成した⁸⁾。Ni 触媒を入れたアルミナポートを石英管に入れ、水平型管状炉に配置した。Ni 触媒は 10% の H₂/He ガスで 600℃、2 時間還元処理を行い、この後、管状炉を 600℃ に保持したまま、C₂H₄/H₂ (4:1) の混合ガスを導入し、4 時間反応させた。上記で合成した CNFs 300 mg を大気中、773 K で 90 時間燃焼した後、燃焼物を 6M-HCL 100 mL に入れ、333 K で 12 時間静置させ Ni 金属微粒子を除去した。この溶液をろ過し、ろ過物を 6M-HNO₃ 100 mL に入れ、333 K で 12 時間静置させた。再度、この溶液をろ過し、ろ過物を大気中、333K で 24 時間乾燥させた。

2-2. CNFs の表面改質・切断処理

精製した CNFs 100 mg を濃硫酸 (95%) : 濃硝酸 (60%) = 3 : 1 (v/v %) の混合液 100mL に入れ、超音波照射 (200 W、39 kHz) を行った。超音波照射時間による CNFs への置換基付加と切断効果を調べるために、照射時間は 2 時間、4 時間、6 時間行った。照射後、ポアサイズ 0.1 μm の PTFE メンブランフィルターでろ過を行い、ろ液が中性になるまで蒸留水でよく洗浄した。洗浄後、ろ過物は大気中、333 K、24 時間以上乾燥させた。

2-3. 評価装置

SEM 観察は Hitachi S-4100 Scanning Electron Microscope を使い、加速電圧 5kV で行った。TEM 観察では、加速電圧 200kV の Hitachi HF-2000 FIELD EMISSION Transmission Electron Microscope を用いた。EDX は NORAN VANTAGE を装備した透過形電子顕微鏡内で測定した。FT-IR 測定は Thermo Nicolet Avtar 360 を使い、KBr に試料を混ぜて透過法によって測定した。X 線回折測定は Cu の特性 X 線 (波長 0.154 nm) を装備した Rigaku の粉末 X 線回折装置を用い、ガラス製の XRD ホルダーに試料を詰めて行った。

3. 結果と考察

図 1 (a)、(b) は CNFs の精製後の SEM 写真と TEM 写真である。未精製 CNFs に観察される少量のアモルファスカーボンを取り除かれ、CNFs が高純度で精製されていることが観察された。形状は曲がりくねった繊維状であり、直径 25 nm – 200 nm、長さ 100 nm – 5.0 μm と広範囲に渡って分布していることがわかった。図 1 (c) の高分解 TEM 写真から観察されるように、CNFs はコーン形をしたグラフィンが繊維軸に沿って重なった構造を持ち、コーンのエッジ部分が繊維軸を頂点にして円錐方向にむき出しになっている。コーングラフィン間の面間隔は約 0.34 nm であり (図 1 (c) の挿入図)、コーンの円錐角は 60° から 120° と様々で、その円錐角は Ni 触媒の形状に依存している。図 1 (d) は精製後の CNFs

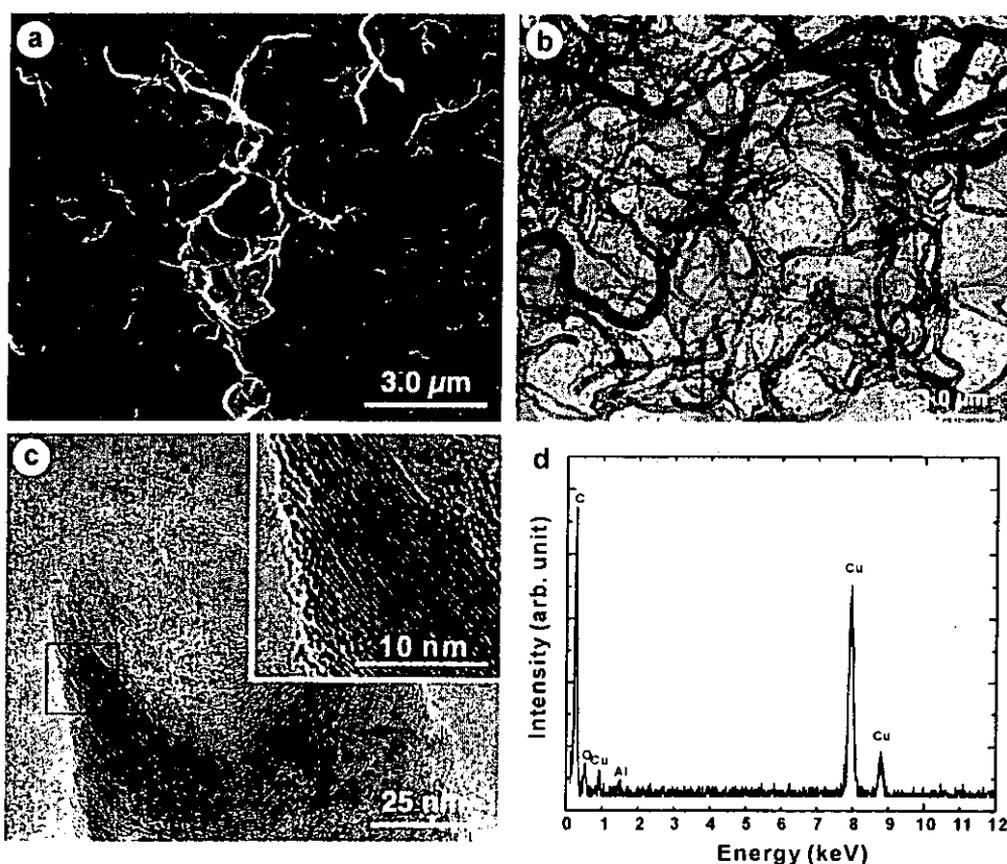


Figure 1. SEM photograph (a), TEM photographs (b and c) of the low magnification and high magnification of the purified cone-stacked carbon nanofibers. Inset shows the lattice image of the cone-graphite layers. EDX spectrum (d) of the purified cone-stacked carbon nanofibers.

の TEM-EDX スペクトルである。Al、Cu の検出は TEM サンプルホルダーと Cu 製 TEM グリッドから由来するものである。サンプルからは C と O が検出され、Ni が検出されないことから Ni 触媒金属は取り除かれていることがわかる。図 2 (a)、(b)、(c) は精製 CNFs を濃硫酸 : 濃硝酸 = 3 : 1 (v/v %) 混合液中で、それぞれ 2 時間、4 時間、6 時間の超音波照射を行った後の SEM 写真である。2 時間、4 時間、6 時間超音波処理した CNFs の平均

長さは 1.5 μm 、800 nm、400 nm であり、超音波照射時間が長くなるにつれて、CNFs の長さが短くなっている。また、未処理 CNFs の長さ分布に比べて、処理後の CNFs は長さ分布のバラツキ度が小さくなっており、超音波照射時間により長さ制御が可能であることがわかった。

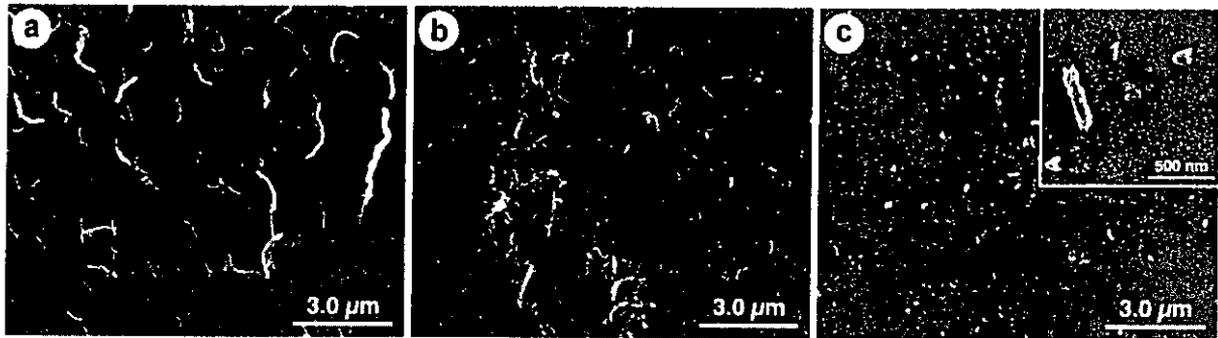


Figure 2. SEM photographs of the cut cone-stacked carbon nanofibers after 2 hrs (a), 4 hrs (b), and 6 hrs (c) of sonication in a mixture of concentrated H_2SO_4 (95%) and HNO_3 (60%).

図 3 は精製 CNFs を濃硫酸：濃硝酸＝3：1(v/v %)混合液中で超音波照射を行った後の XRD パターンである。未精製の CNFs では $2\theta = 26.0 \text{ deg.}$ にコーン状グラファイトの(002)面の回折ピークと、 $2\theta = 44.5 \text{ deg.}$ と $2\theta = 51.8 \text{ deg.}$ に(111)面と(200)面の Ni の回折ピークが観測された。 $2\theta = 26.0 \text{ deg.}$ から見積ったコーン状グラファイトの面間隔は 0.342 nm であり、グラファイトの面間隔 0.335 nm より広いことがわかる。この理由は CNFs を構成するコーングラフィンの円錐角やコーングラフィンのカイラリティーが異なることで、上下のグラフィン間での炭素原子の位置が本来のグラファイトの規則正しい位置からずれが生じているためである。一方、精製 CNFs では $2\theta = 26.0 \text{ deg.}$ に(002)面の回折ピークが強く現れており、Ni の回折ピークは観測されない。Ni が除去されていることがわかる。強酸中で超音波処理を行ったサンプルの(00 l)面の回折ピークは超音波照射時間が長くなるにつれて、低次側の方にシフトしており、(00 l)面の面間隔は 0.348 nm (2 時間)、0.3556 nm (4 時間)、0.366 nm (6 時間)と最大 0.018 nm の増加が観測された。超音波照射後のサンプルの面

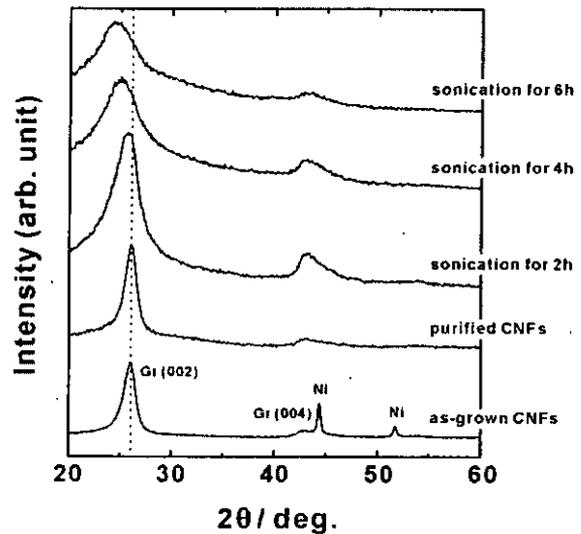


Figure 3. XRD patterns of the CNFs. From bottom, the as-grown CNFs, the purified CNFs, and the sonicated CNFs for 2 hrs, 4 hrs, and 6 hrs.

間隔は「硫酸、硝酸分子のコーン状グラファイトへの挿入⁹⁾」あるいは「酸化されたコーン状グラファイト層間の乱れ」の可能性はある。一方、超音波照射時間が長くなるにつれ、回折ピークがブロードしていることから、グラファイト結晶子が微細化されており、コーン状ナノファイバーが短くなっていることが読み取れる。このことは SEM 観察の結果と一致している。通常、濃硫酸：濃硝酸=3：1(v/v %)混合液中に浸されるグラファイトは、硫酸、硝酸分子がグラファイト層の第1ステージに挿入されて、面間隔が約3倍に膨張することが知られている¹⁰⁾。このような現象を考慮すると、CNFsの切断は湾曲した部分の大きい面間隔をもつ部分に強酸のインターカレントが挿入され、層間が開き、層間の相互作用が弱くなった状態に超音波照射されることによって、層がバラバラに剥離して水中に分散すると推測される。

図4は強酸混合液中で2時間超音波照射を行った切断CNFsの水溶液(濃度 10 mg L^{-1})の2時間放置した写真である。2時間超音波照射を行った切断CNFsは平均の長さ $1.5\text{ }\mu\text{m}$ であるが、非常によく水に分散している。図5は濃硫酸：濃硝酸=3：1(v/v %)混合液中で超音波照射を行ったCNFsの赤外吸収スペクトルである。 1584 cm^{-1} 付近に観測される吸収はグラフィン面内の炭素二重結合の伸縮振動であり、すべてのCNFsの赤外吸収スペクトルに現れている。IRによるグラファイトに付加されている官能基の定性は難しく複雑であるが¹¹⁾、強酸中で超音波照射を2時間、4時間、6時間行った試料では、水酸基(-OH)が付加したグラフィンの炭素-酸素結合(C-OH)の伸縮振動(1240 cm^{-1})、水酸基(-OH)が付加したグラフィンの面内変角振動(1400 cm^{-1})、カルボキシル基(-COOH)の炭素-酸素二重結合(C=O)の伸縮振動(1720 cm^{-1})の吸収スペクトルと同定された。これらの吸収スペクトルから、濃硫酸と濃硝酸による酸化剤によって、コーン状グラファイトのエッジが酸化され、親水基がCNFsのエッジに付加されていることが示唆される。

4. まとめ

CNFsの親水化向上のため、濃硫酸と濃硝酸の混液中でCNFsのエッジを酸化し、水酸基、カルボキシル基を付加させることで、水溶化CNFsを調製した。同時に強酸中の超音波照



Figure 4. The photograph of the cut CNFs dispersed in water for 2 hrs. The cut CNFs were sonicated in strong acids for 2 hrs. (Concentration of 10 mg L^{-1} in water)

射を行うことによって CNFs を切断した。切断された CNFs の長さは 2 時間、4 時間、6 時間の超音波処理に対して、1.5 μm 、800 nm、400 nm と短くなり、超音波照射時間によって長さ制御が可能であることがわかった。我々は、CNFs をナノバイオマテリアルとして利用するために、一段階で簡便に調製できる「CNFs の切断と水溶化」技術を確立した。

謝辞

本研究の一部は、文部科学研究費（基盤(S)14103016、13852016）および厚生科研費（課題 H14-ナノ-021）によるものである。本研究を遂行するにあたり、電子顕微鏡観察に貴重なご支援を頂いた本宮憲一技官に感謝致します。

参考文献

- 1) H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature* **318**, 162 (1985).
- 2) S. Iijima, *Nature* **354**, 56 (1991).
- 3) A. Oberlin, M. Endo, T. Koyama, *J. Cryst. Growth* **32**, 335 (1976).
- 4) R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer, *Science* **296**, 2198 (2002)
- 5) V. L. Gott, J. D. Whiffen, R. C. Dutton, *Science* **142**, 1297 (1963).
- 6) G. M. Jenkins, *Clin. Phys. Physiol. Meas.* **3**, 171 (1980).
- 7) M. Yokoyama, T. Okano, *Advanced Drug Delivery Reviews* **21**, 77 (1996).
- 8) N. M. Rodriguez, *J. Mater. Res.* **8**, 3233 (1993).
- 9) M. D. Levi, E. Levi, Y. Gofer, D. Aurbach, E. Vieil, J. Serosé, *J. Phys. Chem. B* **103**, 1499 (1999).
- 10) S. F. McKay, *J. Appl. Phys.* **35**, 1992 (1964).
- 11) E. Fuente, J. A. Menendez, M. A. Diez, D. Suarez, M. A. Montes-Moran, *J. Phys. Chem. B* **107**, 6350 (2003).

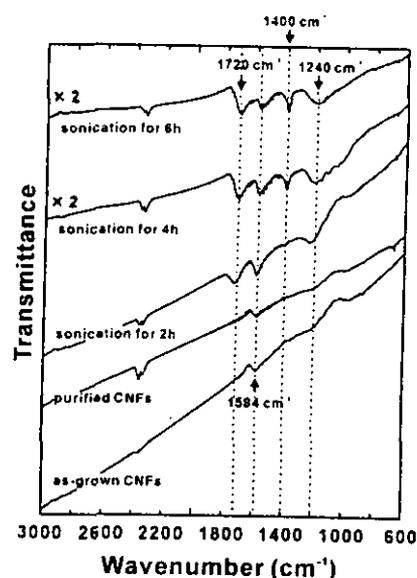


Figure 5. FT-IR spectra of the CNFs. From bottom, the as-grown CNFs, the purified CNFs, and the sonicated CNFs for 2 hrs, 4 hrs, and 6 hrs.

カーボンナノチューブ (CNT) 固化体の特性評価ならびにCNTとTiのHAコーティングに関する研究 ～ HAコーティングに関する研究 ～

東北大学大学院工学研究科附属破壊制御システム研究施設

小野木 伯薫, 橋田 俊之

1. はじめに

ハイドロキシアパタイト: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (以下HAと省略)は生体骨の主な無機成分であり, 骨と直接的に結合する. よってHAセラミックスは生体活性セラミックスと呼ばれ, 骨修復材料として用いられているが, HAセラミックス単体では機械強度が不足しており, 大腿骨など大きな荷重の加わる部位には使用できない. 一方, Ti系金属材料は高い生体適合性を有する金属材料であり骨置換材料として用いられているが, 骨との直接的な結合は期待できない. そこでTi系材料にHAをプラズマ溶射コーティングしたものが人工関節, 人工歯根に使用されている. しかしながら, 溶射によるHAコーティング層は基板金属に本質的には接合しておらずHA/Ti界面強度が不足していること, HAの熱分解等が指摘されており, この問題の解決が望まれている.

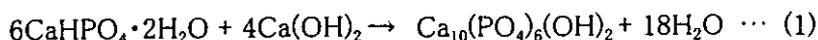
我々はこれまでに, 水熱ホットプレス法 (以下HHP法と省略)を用いることで, HAとTiが数 μm にわたり傾斜し入れ替わる界面構造を有し, 高い界面強度を有するHA/Ti接合体の作製方法を報告している. しかしながら, その接合形態は円柱状HAセラミックスと円柱状Tiバルク体の底面同士の接合である. したがって円柱側面も含めたコーティング, すなわち被接合材料への全面HAコーティング法を確立することが重要である. 本報では, HHP法の原理を応用した二重構造カプセルを用いたHAコーティング法 (ダブルカプセル法) について, HAコーティングの付着力に及ぼすTiへの表面処理の効果について検討を行った.

2. 実験方法

2.1 HAコーティング

HAを接合させる材料は, 工業用純チタン (ニラコ社; 純度99.5%) を直径1.5mm, 高さ20mmの円柱状のものを準備した (以下Tiと省略). 強固なHA/Ti接合を実現させるため, Tiを耐水研磨紙で研磨した後アルカリ性溶液を用いた表面処理を施した. 用いた溶液は濃度5mol/lの水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液である. 処理条件は温度150°C, 処理時間2hである. Ti表面処理について表1に整理する.

本研究において, HHP法を用いて, 以下の化学反応を利用してHAを合成・固化し, 同時にTiと接合させた. 出発原料はいずれも市販試薬を用いた.



リン酸水素カルシウム二水和物 ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: DCPD; 関東化学, 試薬特級, 純度98.0%) と水酸化カル

シウム(Ca(OH)₂; 関東化学, 試薬特級, 純度96.0%)をそれぞれCa/Pのモル比がHAの化学量論組成である1.67となるように秤量し, 乳鉢で1h混合したものをHA出発原料とした。

TiへのHAコーティングの方法として, 材料をカプセル内部に封入してカプセル外部から熱と圧力をかける熱間等方静水圧プレス(HIP)を模倣した二重構造カプセル法を用いた。カプセルの構造概略図をFig.1に示す。TiとHA出発原料を包むカプセル I はFEP製(130°Cで約2割収縮)である。材料を充填したFEPチューブの両端を金属製のクリップで留めることで, 材料自体は流出させずに反応段階で発生する水をここから外部へ排出させることで, HHP法の原理が保たれる仕組である。カプセル I より搾り出された水は外側のポリ塩化ビニリデン製(旭化成: サランラップ)のカプセル II 内に存在するアルミナ粉末(粒径3 μm)中に吸収されることとなる。カプセル II はクリップシーラーで熱圧着処理を施すことでカプセル内部と外部は完全に閉鎖される。またカプセル内部は封をする前に真空ポンプを用いて内部を減圧することで, 粉末物質の流動性の抑制ならびに外部との完全閉鎖を確認する。

この二重構造をもったカプセルをバッチ式オートクレーブ中に入れ, 水を伝熱および圧力媒体として使用することで等方熱間プレス(HIP)を模擬した状態を実現した。処理条件については, 圧力40MPa, 処理温度135°C, 処理時間は最高24hrsである。

Table 1 Ti表面処理条件

Name	Finish	Temp.	Time	600°Cheat
A	#1500	150°C	2hrs	No
B	#80	150°C	2hrs	No
C	#80	60°C	24hrs	1h
Ref.	#1500	-	-	-

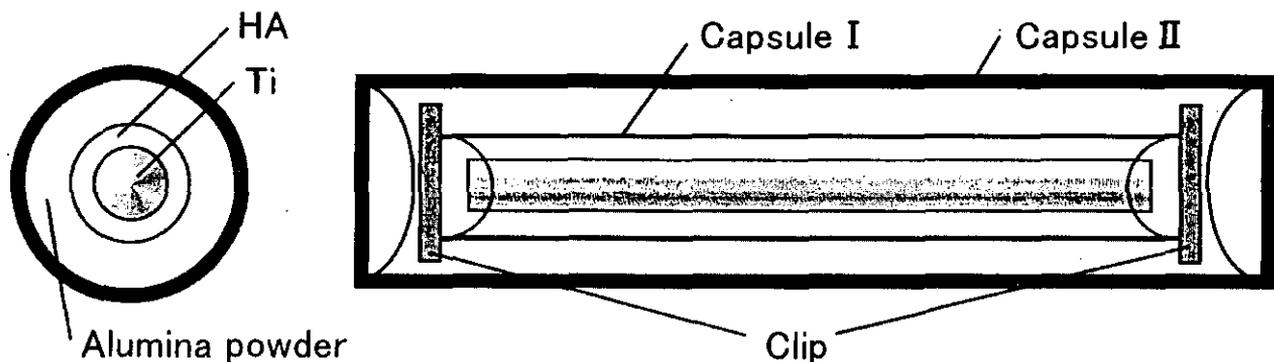


Fig.1 二重カプセルの構造概略図

2.2 界面強度試験

得られたHAコーティング材は, HA/Ti界面強度を評価するために引抜試験に供した。試料を樹脂中に片側10mm程度埋入して固めた後, インストロン型材料試験機を用い, 引張速度0.5mm/minで引抜試験を実施し, 荷重-変位曲線を得た。これより界面せん断強度 τ , 界面破壊エネルギー G をそれぞれ下記式(2), (3)より導出し, これらの値でHAコーティングの付着強度を評価した。また界面強度試験に供した試料から削り落としたHAコ

ーティングは、粉末X線回折パターン解析(XRD)に供し、作製されたHAコーティングの生成相の同定を行った。

$$\text{界面せん断応力: } \tau = \frac{P_{\max}}{\pi dL} \quad \dots (2),$$

$$\text{界面破壊エネルギー: } G = \frac{A}{\pi dL} \quad \left(A = \int_0^L P d\delta \right) \quad \dots (3)$$

ここで P は荷重、 d は直径(ϕ 1.5mm)、 L は試験片の埋込深さ、 δ は変位である。

3. 結果

得られたHAコーティング試料を引抜試験に供したときの荷重-変位曲線から τ 、 G をそれぞれ算出し、オートクレーブ処理時間との関係をFig. 2, 3それぞれに整理する。HAコーティングの粉末XRD解析結果より、出発原料が完全にHAに転化するのに、オートクレーブ処理が12時間程度必要であることが判明しており、よってFig. 2, 3中、オートクレーブ処理10時間の位置に便宜的に点線を引いてある。この線の右側の領域ではコーティングは完全にHAに転化しており、この領域における付着強度について注目した。

全体としての傾向として、Ti表面処理A, B, Cの順に付着強度が大きいことがわかる。すべての表面処理において同じNaOH水溶液を用いているが、150℃での水熱処理を施したもののほうが付着強度は高く、また同じ水熱処理を施した材料でも、研磨紙の粒度が小さい、つまりTi表面粗さが小さいほど付着強度が高いことがわかった。プラズマ溶射などによるセラミックスコーティングでは、その付着特性は機械的なアンカーリングに依存するものであり、表面粗さが大きいほうが高い付着強度が得られる。しかしながら、ダブルカプセル法によるHAコーティングについては、こうした傾向は当てはまらないものと思われる。今後その詳細について検討する必要がある。

参照データとして、NaOH水溶液処理を行わない“Ref”試験片のデータもFig. 2, 3中に記した。これと比較すると処理条件A, BについてはHAコーティング付着特性向上が顕著である。特にAについては、引抜試験後の写真(Fig. 4)に見られるように、HAがTi上に残留していることが目視でも確認できる。これはき裂がHA/Ti界面ではなく、HAコーティング中を進展していることを証明するものである。換言すれば、界面強度はHAコーティング自身の強度と同等ないしそれ以上であることが示唆するものである。算出されたせん断強度 τ は4.2MPaであり、界面強度はこれ以上であるものと思われる。また処理条件Cについてはその溶液処理の効果は希薄であり、付着強度が低下する場合も認められた。つまり特定の条件下でNaOH処理を行わないと付着強度の向上は望めないことがわかった。

それぞれの表面処理材について、オートクレーブ処理24時間の試験片のせん断強度とそのき裂進展サイトをTable 2にまとめた。本報により、ダブルカプセル法において高い付着強度とHA完全転化を両立する、Ti表面処理条件が見出された。

4. まとめ

ダブルカプセルによるHAコーティングの付着強度について、Ti表面処理の効果について検討した。適切

な条件でTi表面処理を行った場合、HA/Ti界面がHAコーティング自体と同等ないしそれ以上のせん断強度を有し、かつ従来の方法では不可避であった熱分解のないHAコーティングが作製できることが示された。本報は純Tiのみをコーティング対象としているが、新規生体材料としての適用が目指されているカーボンナノチューブ固化体のTi被覆体についても同様の方法でHAコーティングは可能であると考えられる。

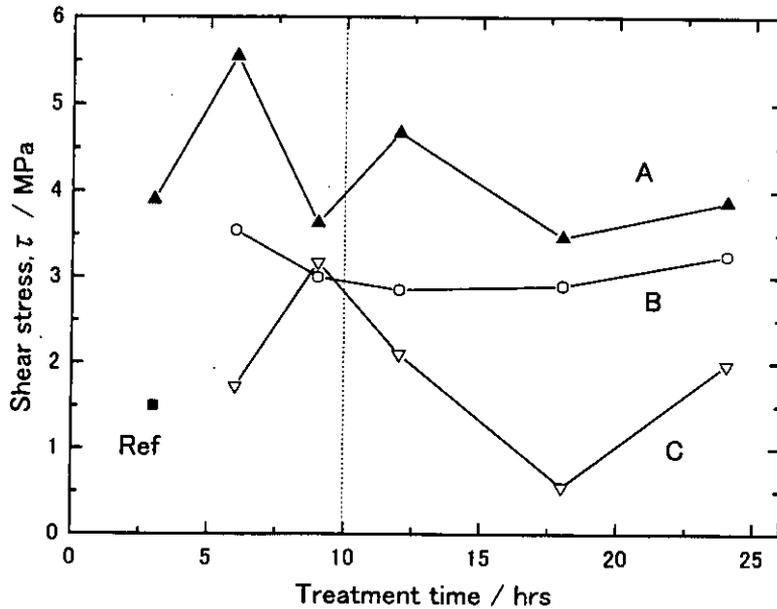


Fig.2 それぞれのTi表面処理材のせん断強度とオートクレーブ処理時間の関係

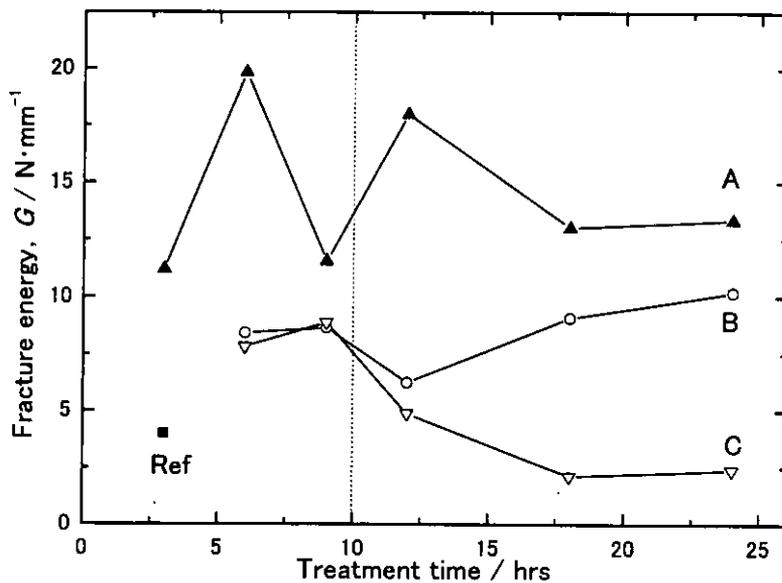


Fig.3 それぞれのTi表面処理材の界面破壊エネルギーとオートクレーブ処理時間の関係



Fig.4 引抜試験後の試験片(表面処理A, オートクレーブ処理24時間)

Table 2 Ti表面処理におけるせん断強度とき裂進展経路

Name	Finish	Temp.	Time	600°Cheat	τ (24hrs)	Crack path
A	#1500	150°C	2hrs	No	4.2MPa	HA
B	#80	150°C	2hrs	No	3.1MPa	Interface
C	#80	60°C	24hrs	1h	1.7MPa	Interface
Ref.	#1500	-	-	-	*1.5MPa	Interface

*オートクレーブ処理2時間のデータ

カーボンナノチューブの生体材料への応用

細胞培養担体としての応用

○青木 尚史、佐々木 紘子、王 蔚、山本 悟、横山 敦郎、川崎 貴生
野田坂 佳伸、進藤 正信、向後 隆男、赤坂 司、宇尾 基弘、亘理 文夫
北海道大学大学院歯学研究科
佐藤 義倫、田路 和幸
東北大学大学院環境科学研究科

1. 研究目的:細胞培養担体としての利用を考え、今回は MWCNT 分散液を濾過することによる濾過膜上で細胞培養をし、その細胞数を計測して比較した。

2. 研究方法:

1)材料

CNTコーティング膜: NanoLab 社製CNTを蒸留水に懸濁しPC(ポリカーボネイト)およびPTFE膜で吸引濾過することにより(Fig.1, 2)、CNTをPCおよびPTFEに付着させた(CNT+PC膜、CNT+PTFE膜)(Fig.3,4)。

2)方法

PC、CNT+PC膜およびPTFE、CNT+PTFE膜を1枚ずつ6cm polystyrene dish に置きヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞であるSaos2を 1.0×10^5 個播種した。10%牛胎児血清および抗生物質を添加したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用いて 37°C 、5% CO_2 気相下で培養をした。培養3日および10日後、SEMにて観察をした。また、培養3日後の細胞数を計測した。計測法としては、SEM(300倍)で1枚の膜につき10カ所ずつランダムに撮影し、そのSEM像上で細胞数の計測を行った。ただし、画像上の大きさが5mm未満の細胞は計測しなかった。各種膜4枚ずつ培養を行い、細胞数を計測した。

3. 結果

1)CNT+PC膜について

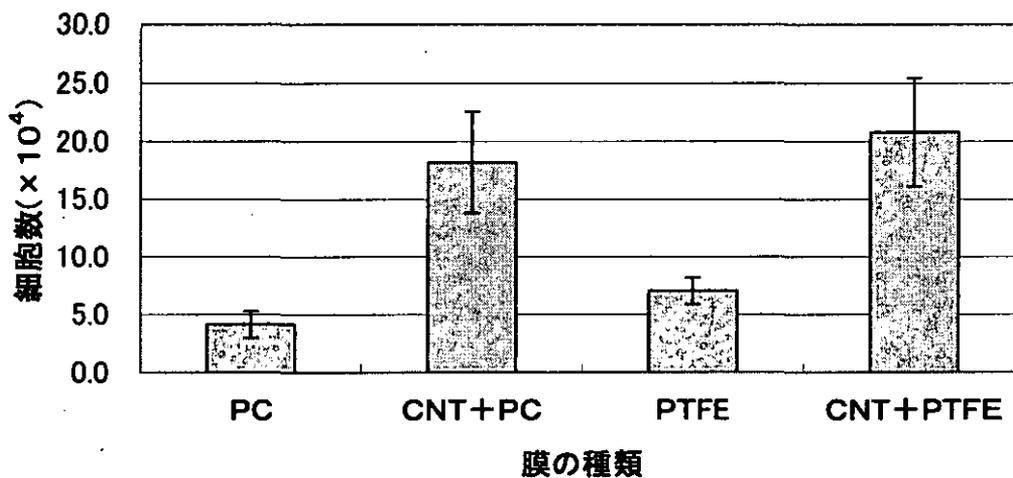
培養3日後、CNT+PC膜上で細胞の伸展はみられたが、対照であるPC膜上では伸展している細胞は少なかった(Fig.5,6,7)。細胞数はCNT+PC 18.2×10^4 個に対してPC膜 4.2×10^4 個で約4.3倍の値を示した(Table1)。CNT+PTFE膜では播種細胞数の約2倍に増加していたが、PC膜では、播種細胞数の約1/2であった。

2)CNT+PTFE膜について

培養3日後、CNT+PTFE膜上で細胞は伸展していたが、対照であるPTFE膜上では伸展している細胞は少なかった(Fig.8,9,10,11)。細胞数はCNT+PTFE膜 20.8×10^4 個に対してPTFE膜 7.1×10^4 個で約2.9倍の値を示した(Table1)。CNT+PTFE膜では、播種細胞数と比較して、3日後の細胞数は約2倍であったが、PTFE膜では、0.7倍であった。

Table1 SEMによって計測された細胞数(×10⁴個)

	PC	CNT+PC	PTFE	CNT+PTFE
サンプル1	3.0	21.6	6.0	16.4
サンプル2	4.7	13.2	6.8	26.3
サンプル3	5.9	14.6	9.0	24.6
サンプル4	3.2	23.4	6.5	15.9
平均	4.2	18.2	7.1	20.8
SD	1.2	4.4	1.2	4.7



4. 考察

細胞数を計測するのに、膜上の細胞にトリプシン処理を行ったところCNTでコーティングしていない膜では、細胞を膜から剥離することは可能であるが(Fig.12)、コーティングしている膜上の細胞でトリプシン処理を行ったところ細胞は球状になるものの膜から剥がれ難くなった(Fig.13)。これは、CNTが細胞に絡みついているために細胞は膜から剥がれ難くなったと推察される(Fig.14)。そのため、今回、細胞数を計測するために3日培養を行った膜のSEM像上で細胞数の計測を行った。計測した結果、コーティングしている膜の方がPC、PTFE共に細胞数は多く、細胞も伸展していた。CNT+PC膜とCNT+PTFE膜では差はほとんどないが10日培養ではSEM像からPTFE膜の方が多いう傾向を示し(Fig.15、16、17、18)、基盤(膜)の影響が関係していると思われる。今後、10日培養もSEM像で計測し、膜とCNTの影響を調べていく予定である。また、細胞が剥がれにくい点を利用して何かできるものを検討していきたい。

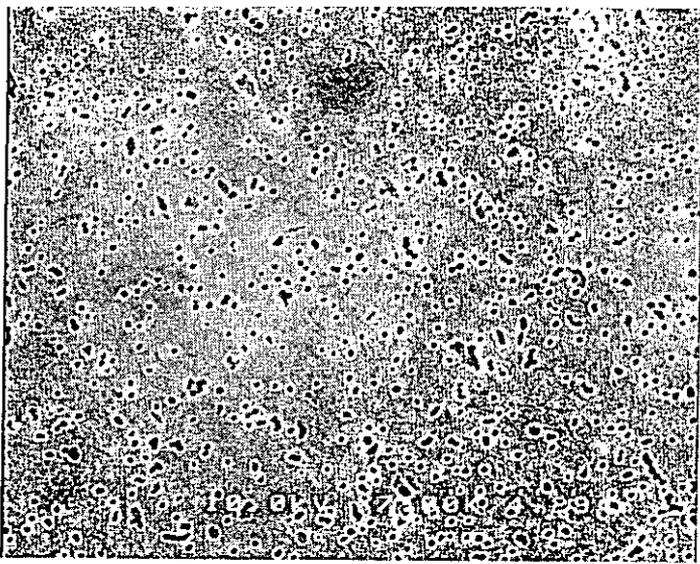


Fig.1 PC膜

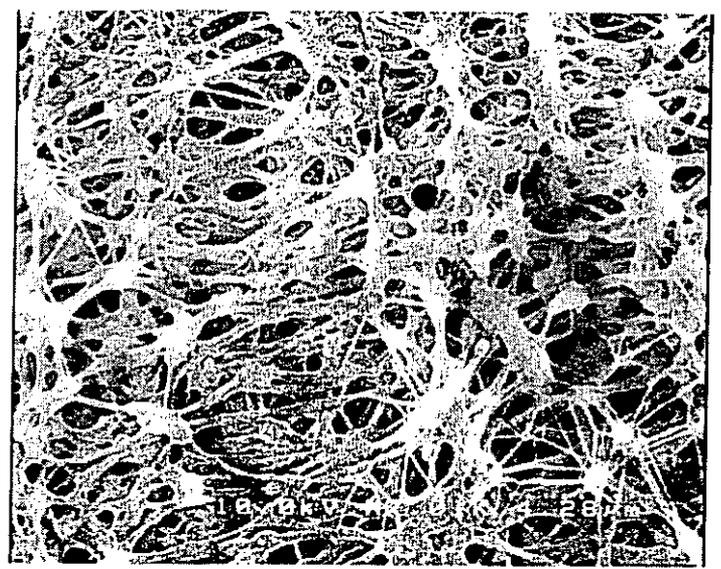


Fig.2 PTFE膜

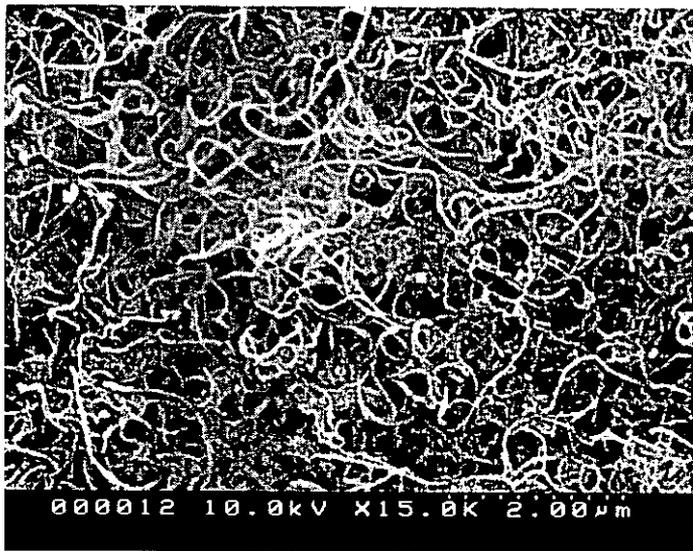


Fig.3 CNT+PC膜

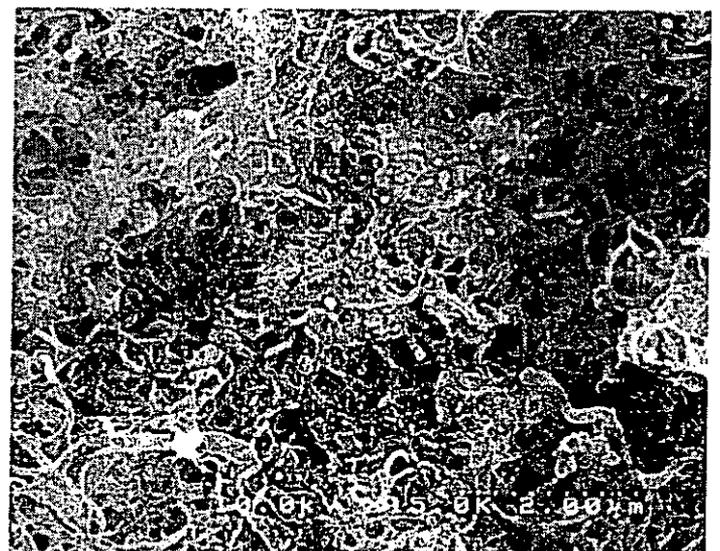


Fig.4 CNT+PTFE膜

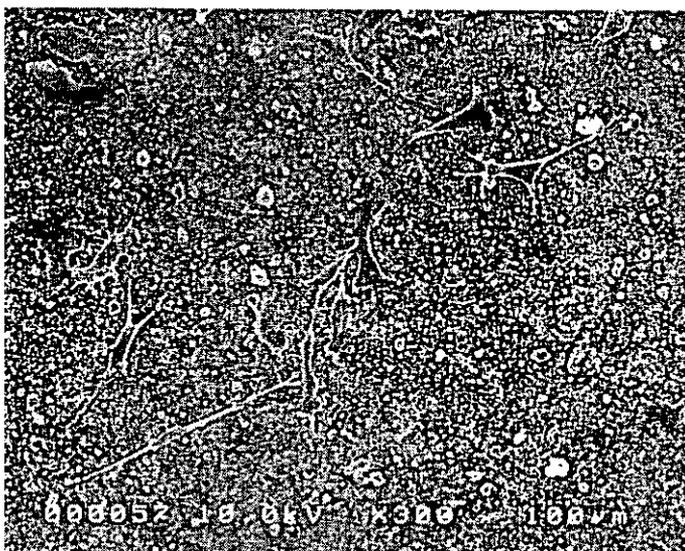


Fig.5 CNT+PC膜 培養3日後のSEM像

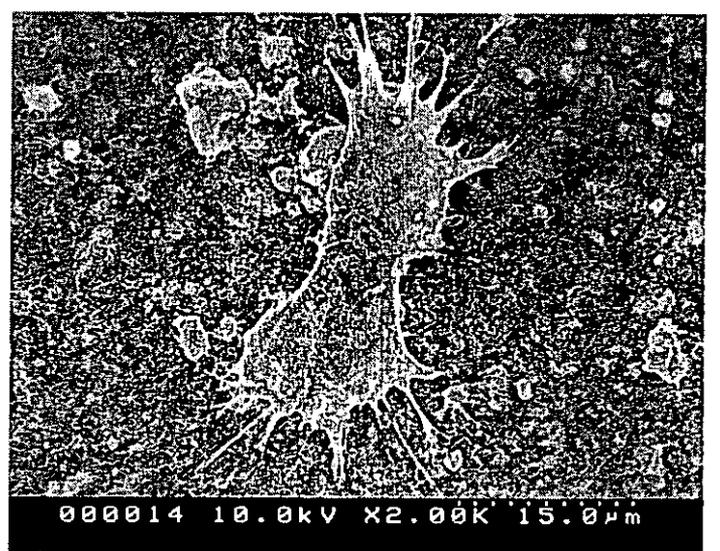


Fig.6 CNT+PC膜 細胞の強拡大像

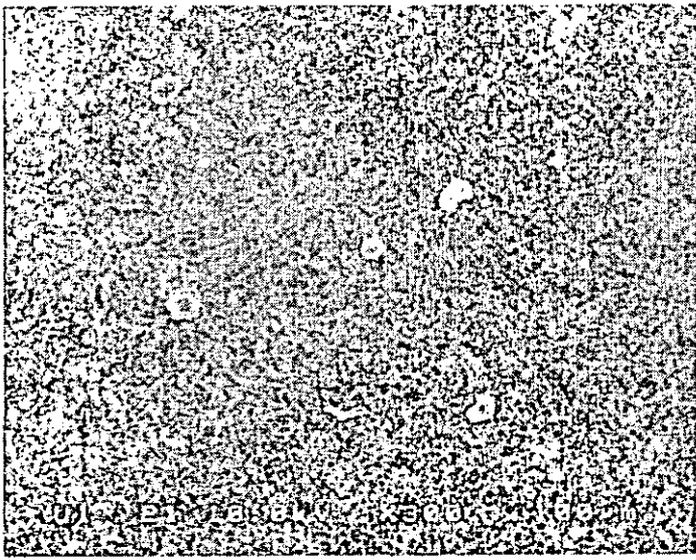


Fig.7 PC膜 培養3日後のSEM像

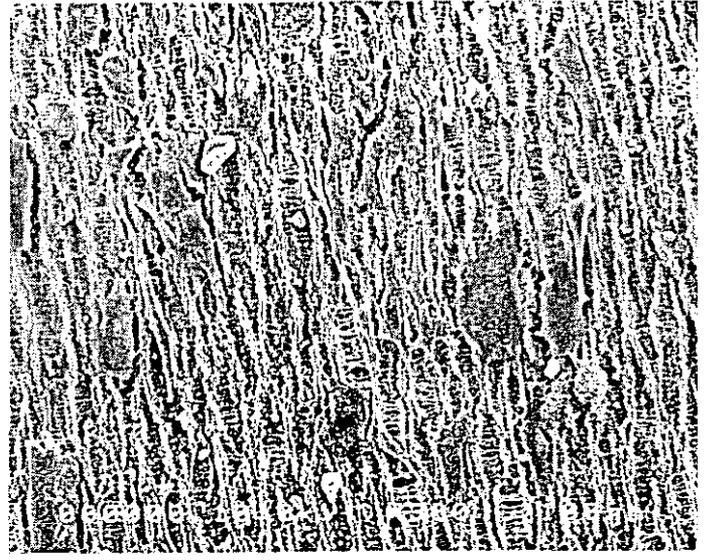


Fig.8 CNT+PTFE膜 培養3日後のSEM像



Fig.9 CNT+PTFE膜 細胞の強拡大SEM像

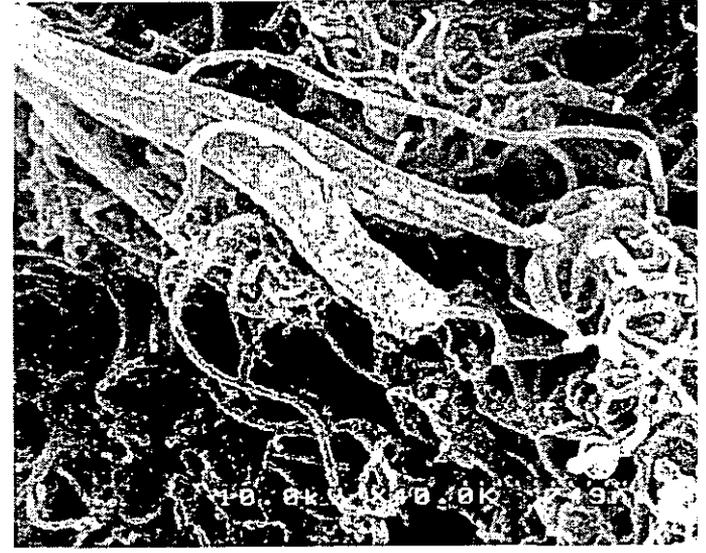


Fig.10 CNT+PTFE膜 細胞の突起部の強拡大SEM像

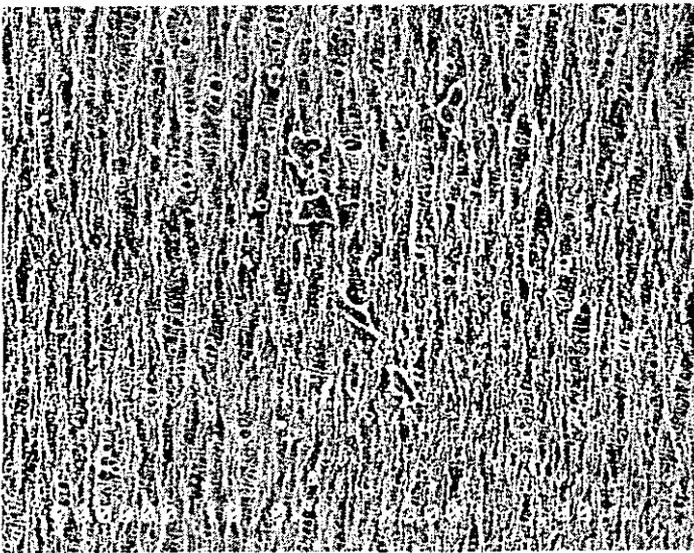


Fig.11 PTFE膜 培養3日後のSEM像

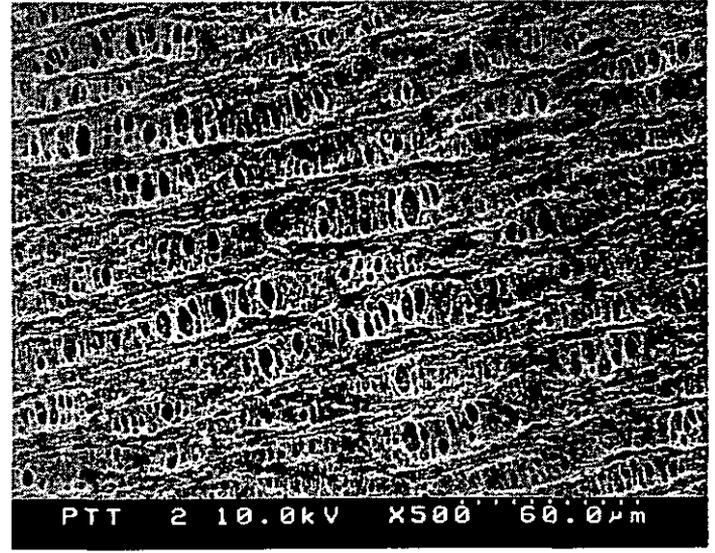


Fig.12 PTFE膜 トリプシン処理後

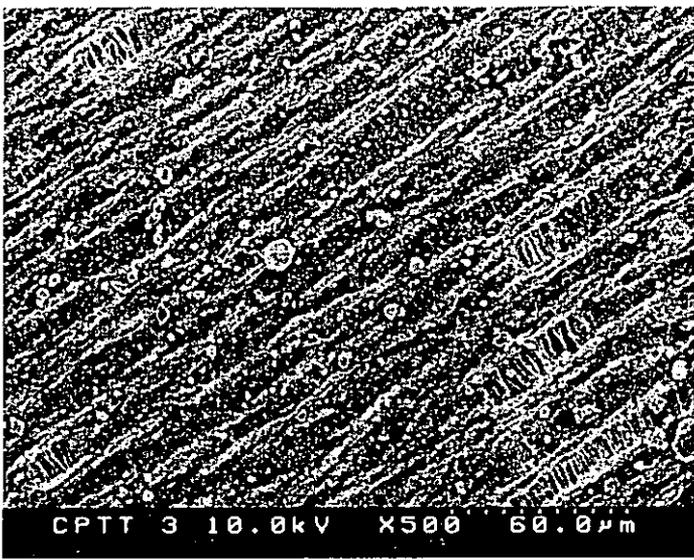


Fig.13 CNT+PTFE膜 トリプシン処理後

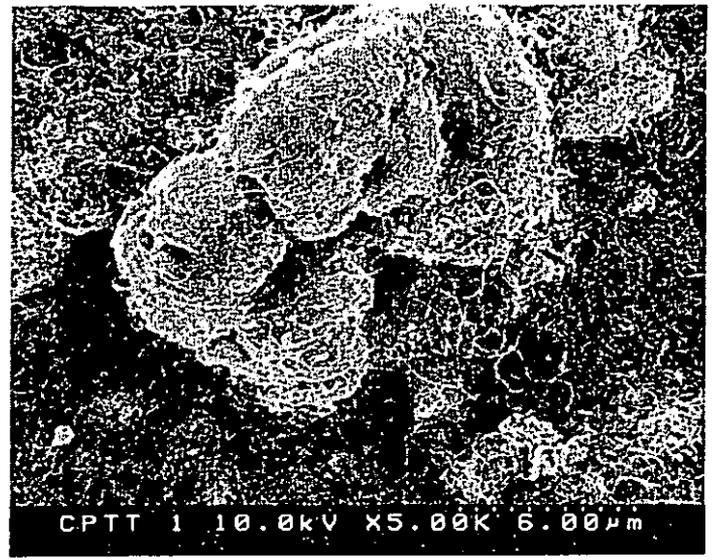


Fig. 14 トリプシン処理後の細胞の強拡大像

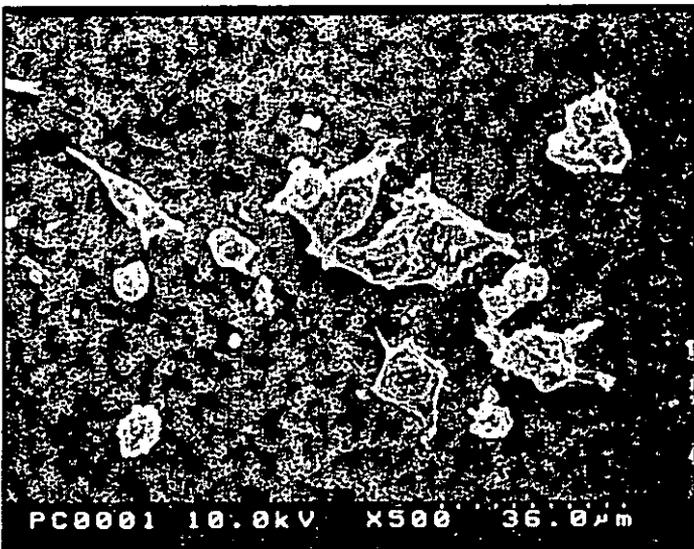


Fig.15 PC膜 培養10日後のSEM像

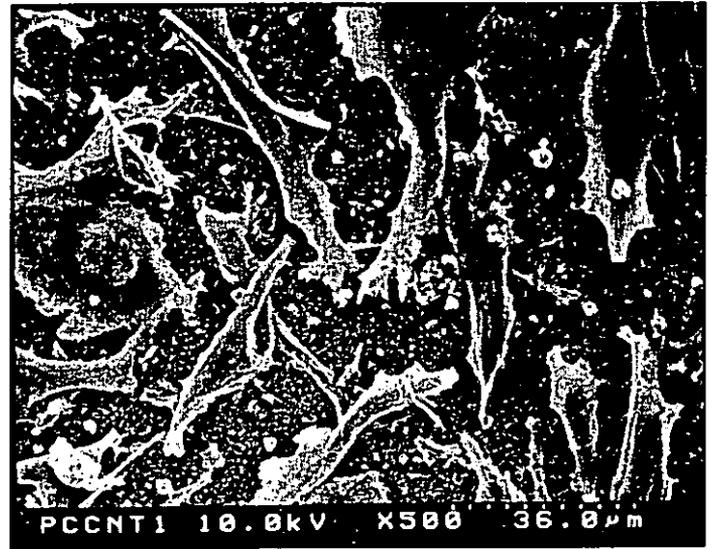


Fig.16 CNT+PC膜 培養10日後のSEM像

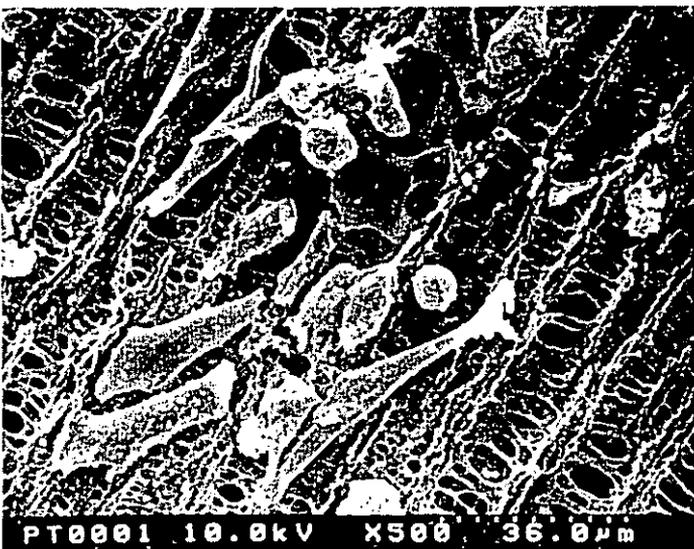


Fig.17 PTFE膜 培養10日後のSEM像

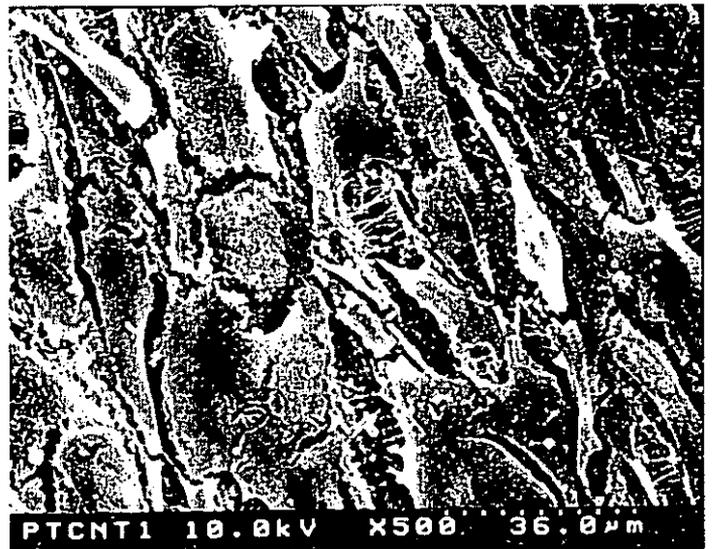


Fig.18 CNT+PTFE膜 培養10日後のSEM像

カーボンナノチューブの機能化とバイオへの応用

～ 糖質化合物による修飾とその機能 ～

北海道大学大学院歯学研究科

○赤坂 司、佐々木絃子、青木尚史、横山敦郎、田村一央、宇尾基弘、亘理文夫

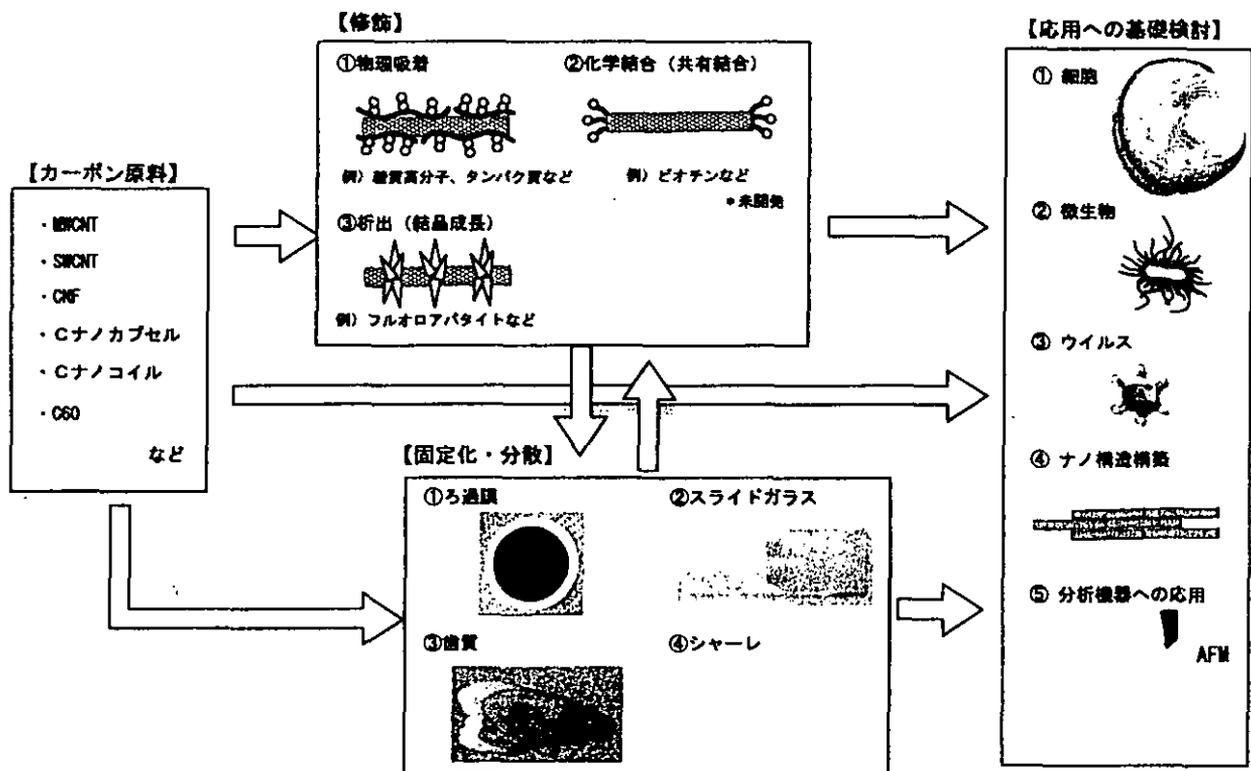
東北大学大学院工学研究科

佐藤義倫、田路和幸

緒言

近年、最も注目されている材料の1つにカーボンナノチューブ (CNT) が挙げられ、エレクトロニクス分野やエネルギー分野を中心に集中的な研究が進行中である。報告例は多いとはいえないが、CNTのバイオ分野への応用研究も開始されており、AFMの探針、タンパク質の結晶化、バイオセンサーへの応用が注目を集めている。本研究ではバイオ分野におけるCNTのさらなる応用を目的として、CNTの機能化法やバイオ応用を検討することとした (下図参照)。

カーボンナノチューブの機能化とバイオ応用 - 研究開発スキーム -



上記、研究開発スキームを大別すると、【修飾】、【固定化・分散】、【応用への基礎検討】とに分けることができる。今回の研究成果報告会では、物理吸着を利用した修飾法のなかでも「糖質化合物による修飾とその機能」に焦点をあてて報告する。

「糖質化合物による修飾とその機能」

1. 研究目的

カーボンナノチューブに生物学的に重要な分子を結合させることは、様々な応用を考える上で重要である。他の研究者により、化学的および物理的な方法によりビオチン、DNA、タンパク質、酵素、多糖等の分子を結合させた報告がなされている。しかしながら、近年次世代ポストゲノムとして注目を集めている糖鎖を結合させた報告はまだない。ここでは、人工複合糖質高分子を用いてのMWCNT表面修飾を中心に、その他の糖質化合物による修飾および表面に結合した糖鎖のレクチン認識能に関して検討した。

2. 研究方法

カーボン原料

MWCNT (NanoLab社、純度80%、番号A1、塩酸処理済)

MWCNT (MTR社、純度75-85%、番号M1) を塩酸処理

糖鎖化合物および関連タンパク質原料

PVLA : Poly-(N-p-vinyl benzyl-0-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-D-gluconamide) (MW : 5×10^4 、生化学工業)、FITC-PVLA : FITC-labeled PVLA (生化学工業)、Biotin-PVLA : Biotin-labeled PVLA (生化学工業)、PVCA : Poly-(N-p-vinyl benzyl-0-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-D-gluconamide) (MW : 5×10^4 、生化学工業)、B-Disaccharide BP-Probe[Galα1-3Galβ] (生化学工業)、Octyl β-D-galactopyranoside (Sigma)、Octyl β-D-glucopyranoside (Sigma)、3,6-Di-O-(α1-3, α1-6 D-Mannopyranosyl)-D-Mannopyranose-BSA (Dextra Laboratories Ltd.)、Albumin from bovine serum(BSA), fluorescein conjugate(Molecular Probes, Inc.)、Albumin Bovine Fraction V(Sigma)

レクチンおよびアビジン原料

Rhod-RCA₁₂₀ : rhodamine-labeled *Ricinus communis* agglutinin (β-galactose specific lectin, Vector Laboratories, Inc.)、FITC-RCA₁₂₀ : FITC-labeled RCA₁₂₀ (生化学工業)、Rhod-ConA : rhodamine-labeled concanavalin A (α-glucose- or α-mannose- specific lectin, Vector Laboratories, Inc.)、FITC-ConA : FITC-labeled ConA (生化学工業)、FITC-EEL : FITC-labeled *Euonymus Europaeus* Lectin (α-galactose specific lectin, Vector Laboratories, Inc.)、Streptavidin-FITC(Sigma)

実験方法

糖質化合物によるMWCNTの表面修飾

MWCNT (NanoLab or MTR) をPBSに加え濃度25μg/500μLとし、超音波処理を15分間行った。この溶液に10μg 糖質化合物 (またはその蛍光ラベル化物) を加え、さらに15分間超音波処理を行い30分

インキュベートした。その後、遠心分離 (14,000rpm, 10min) によりMWCNTを底に集め、PBS×3回による洗浄を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察を行うためMWCNT凝集体を少量のPBSに超音波を使用せずに分散させ、一部をスライドガラス上へ滴下し乾燥を防ぐためカバーガラスをした。CLSM観察は、スライドガラス上でMWCNTの凝集体を探し、レーザー透過像 (488nmアルゴン)、FITC像 (ex 488nm Ar、em 515-565nm)、Rhod像 (ex 543nmHe-Ne、em 590nm以上) を得た。

- * MWCNT/PVLA : MWCNTにPVLAに相互作用させた化合物を示す。
- * MWCNT/FITC-PVLA : MWCNTにFITC-PVLAを作用させた化合物を示す。

MWCNT/糖質化合物とレクチン (またはアビジン) の相互作用

少量のMWCNT (NanoLab or MTR)/糖質化合物をPBSに加え、(Rhod- or FITC-) RCA₁₂₀、(Rhod- or FITC-) ConA、FITC-EEL、FITC-Streptavidinを最終濃度450nMとなるように加えた。1時間インキュベート後、遠心分離 (14000rpm, 10min) によりMWCNTを集め、PBS×3回による洗浄を行った。上記と同様に溶液としたものをCLSMにより観察した。

MWCNTとレクチンの相互作用

MWCNT (MTR) をPBS (+) に加え濃度25 μ g/500 μ Lとし、超音波処理を15分間行った。この溶液にRhod-RCA₁₂₀またはRhod-ConAを最終濃度450nMとなるように加え、1時間インキュベートした。その後、遠心分離 (14,000 rpm, 10min) によりMWCNTを集め、PBS×3回、H2O×2回による洗浄を行った。溶液としたものをCLSMにより観察した。

アルブミン共存下におけるMWCNT/Tri-Man-BSAとレクチンの相互作用

少量のMWCNT (MTR)/Tri-Man-BSAをPBSに加え、さらに20 μ gのBSAを加え10分間インキュベートした。続いて、FITC-RCA₁₂₀またはFITC-ConAを最終濃度450nMとなるように加え、1時間インキュベートした。遠心分離 (14000rpm, 10min) によりMWCNTを集め、PBS×3回による洗浄を行った。上記と同様に溶液としたものをCLSMにより観察した。

3. 研究結果と考察

ポリスチレン型人工糖質高分子によるMWCNTの修飾

(1) ポリスチレン型人工糖質高分子とレクチンの相互作用

ポリスチレン型人工糖質高分子に関しては前回の報告会にて一部を報告したが、今回はさらに深く検討を行った。PVLAの結合を明らかに観察するため、FITCラベルされた糖質高分子であるFITC-PVLAを用いて溶液中における蛍光顕微鏡観察を行った。MWCNT/FITC-PVLAのCLSM観察結果をFig. 1に示した。MWCNT (NanoLab) の顕微鏡観察場合、チューブ直径が細いためチューブの一本一本